

- 156

- [3] 卫生部. GB18871—2002 电离辐射防护与辐射源安全基本标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [4] 卫生部. GBZ130—2002 医用 X 线诊断卫生防护标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [5] 卫生部. GBZ 128—2002 职业性外照射个人监测规范 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [6] 慈捷元, 任梅芳, 李胜浓. 放射性职业人群细胞遗传学效应检测与分析 [J]. 职业与健康, 2007, 23 (2): 900—901.
- [7] 梁丽君, 刘志红, 任海燕, 等. 放射性从业人员染色体畸变及受照剂量情况分析 [J]. 中国公共卫生管理, 2006, 22(5): 395—396.

- [8] 仲志鸿, 韩方岸, 宋寅生, 等. 387例放射工作人员淋巴细胞遗传学分析 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1247.
- [9] 王喜爱, 韩林, 王平, 等. 761名放射工作人员外周血淋巴细胞微核率分析 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2009, 29(3): 276.
- [10] 林海群, 刘伟, 乔建维. 医用 X 射线工作人员染色体畸变及微核分析 [J]. 中国职业医学, 2004, 31(1): 21—22.
- [11] 张良安, 马吉增, 潘自强. 全国职业照射基本情况分析 [C]. 全国职业照射个人剂量检测与评价学术研讨会论文集汇编. 太原: 中国辐射防护学会, 2004.

收稿日期: 2010-09-03

(宋艳萍编校)

## 【论 著】

## 线粒体 DNA 缺失和功能缺失对核基因影响\*

高春鹏, 仲来福, 任翔, 姜丽平, 耿成燕, 姚晓峰, 曹军

**摘要:** 目的 探讨线粒体 DNA (mtDNA) 缺失和线粒体功能缺失对核基因表达的影响。方法 应用人全基因组芯片分别对 mtDNA 缺失、线粒体功能缺失及正常 HepG2 细胞的核基因表达谱进行生物信息学分析。结果 与正常 HepG2 细胞比较, 核基因表达差异倍数 > 2 倍的 mtDNA 缺失细胞共有 5 489 个, 其中 3 350 个上调, 2 139 个下调; 而线粒体功能缺失细胞共有 3 334 个, 其中 1 457 个上调, 1 877 个下调; mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对细胞信号途径均有明显影响, 与正常 HepG2 细胞比较, 线粒体功能缺失时信号途径差异明显的有 334 个, mtDNA 缺失时信号途径差异明显的有 188 个。结论 mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对核基因表达均有明显影响, mtDNA 缺失对核基因表达的影响比功能缺失的影响更大, 其可能机制在于对不同信号途径的影响。

**关键词:** 线粒体 DNA 缺失; 线粒体功能缺失; 核基因表达; 人全基因组芯片

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)01-0050-02

**Effects of mitochondrial DNA-depletion and functional deficiency on expression of nuclear DNA** GAO Chun-peng, ZHONG Lai-fu, REN Xiang et al Department of Hygiene, Dalian Medical University (Dalian 116044, China)

**Abstract Objective** To study the effects of mitochondrial DNA (mtDNA)-depletion and mitochondrial functional deficiency on the expression of nuclear DNA. **Methods** Using human whole genome chip, the expression profiles of nuclear DNA in mtDNA-depleted HepG2 cells and mitochondrial function deficient HepG2 cells were analyzed. **Results** Among 41 000 genes, there were 5 489 genes differentially expressed in mtDNA-depleted HepG2 cells compared with normal HepG2 cells (the fold change > 2.0), with 3 350 up-regulated and 2 139 down-regulated. In mitochondrial function deficient HepG2 cells, there were 3 334 genes differentially expressed, with 1 457 up-regulated and 1 877 down-regulated. The effects of mtDNA depletion and mitochondrial function deficiency on cell signaling pathways were significantly different and imposed different effects on different signaling pathways. **Conclusion** Both mtDNA depletion and mitochondrial function deficiency induce significant different expression of nuclear DNA. The effect of mtDNA depletion is more serious as compared with that of mitochondrial function deficiency. The mechanism may underlie the different effects on different signaling pathways.

**Key words** mitochondrial DNA depletion; mitochondrial function deficiency; nuclear DNA expression; whole human genome oligo microarray

线粒体是细胞进行有氧代谢的场所, 在各种致病因素作用下线粒体极易出现各种结构和功能损伤<sup>[1]</sup>。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是惟一存在细胞核以外的遗传物质, 是线粒体蛋白质合成所必需<sup>[2]</sup>。mtDNA 极易受到活性氧的攻击, 而产生氧化性损伤<sup>[3]</sup>。前期研究发现, 姜黄素对 HT-29 细胞的 mtDNA 和核 DNA (nDNA) 损伤均呈剂量依赖关系, 并且对 mtDNA 的损伤作用明显大于 nDNA<sup>[4]</sup>, 表明 mtDNA 损伤可能是导致细胞功能改变的根源。为探讨 mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对核基因表达的影响, 本研究采用

人全基因组芯片分析 mtDNA 缺失 HepG2 细胞和线粒体功能缺失 HepG2 细胞中 nDNA 的表达情况。现将结果报告如下。

## 1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 羰基氰 4-(三氟甲氧基)苯胺、溴化乙锭 (EB) (美国 Signa 公司); TR Izol 试剂、胎牛血清 (美国 GIBCO 公司); 芯片杂交试剂盒、表达谱基因芯片 (上海康成生物公司)。CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 FORMA 公司)。

1.2 细胞 人肝癌细胞 HepG2 (中国协和医科大学, ATCC H B28065)。采用含双抗 (100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素) 及 10% 胎牛血清的含非必需氨基酸的最低限度的基本培养基 (MEM-NEAA), 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养细胞, 取处于指数生长期的细胞用于实验。

## 1.3 细胞处理

1.3.1 mtDNA 缺失的 HepG2 细胞制备 参考文献 [5], HepG2 细胞连续暴露于添加 EB (50 ng/mL)、丙酮酸盐 (100

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30771820); 辽宁省高等学校科研计划项目 (2008157)

作者单位: 大连医科大学卫生学教研室, 辽宁 大连 116044

作者简介: 高春鹏 (1984—), 男, 吉林长春人, 硕士在读, 主要从事化与分子毒理学研究。

通讯作者: 曹军, E-mail: caojunh@163.com

$\mu\text{g/mL}$ )和尿苷 ( $50\ \mu\text{g/mL}$ )的培养基中,经过 7代培养后,其 mtDNA 几乎完全缺失,PCR 测定 mtDNA 的含量  $< 5\%$  时,进行克隆培养即为 mtDNA 缺失的 HepG2 细胞。

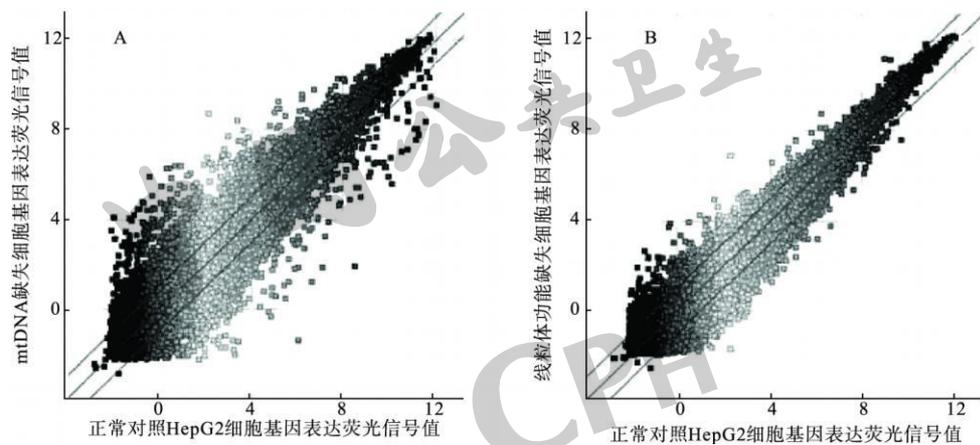
1.3.2 线粒体功能缺失的 HepG2 细胞制备 参考文献 [6] 采用线粒体功能抑制剂羰基氰 4-(三氟甲氧基)苯腈连续处理 HepG2 细胞 24h 荧光比色法检测线粒体膜电位,确定线粒体功能受损伤,即为线粒体功能缺失的 HepG2 细胞。

1.4 全基因组表达谱芯片样品制备和检测 用 TR Izol 试剂分别提取正常 HepG2 细胞和 mtDNA 缺失、线粒体功能缺失 HepG2 细胞的总 RNA,放入  $-80\ ^\circ\text{C}$  冰箱中保存并干冰冷冻送样。芯片杂交和检测由上海康成生物公司完成。

1.5 统计分析 芯片扫描所得数据用 Agilent GeneSpring GX 10.0 软件进行计算和处理,组间比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对核基因表达影响



注: A: mtDNA 缺失 HepG2 细胞和正常对照 HepG2 细胞比较; B: 线粒体功能缺失的 HepG2 与正常对照组细胞比较

图 1 基因表达荧光信号比值散点图

2.2 mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对细胞信号途径影响 对上述基因芯片得到的差异表达基因所涉及到的信号途径进行统计分析,结果表明,与正常 HepG2 细胞比较,mtDNA 缺失细胞中的信号途径差异明显 ( $P < 0.05$ ) 的有 315 个,而线粒体功能缺失 HepG2 细胞,信号途径差异明显 ( $P < 0.05$ ) 的有 334 个,mtDNA 缺失细胞与线粒体功能缺失细胞比较,信号途径差异明显 ( $P < 0.05$ ) 的有 188 个,表明 mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对细胞信号途径均有明显影响,而且它们对不同信号途径的影响又有较大差别。

## 3 讨论

本研究结果表明,mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对核基因的表达均有影响。线粒体是真核生物中细胞的能源中心。因此,线粒体功能缺失使细胞失去了原动力,从而诱导核基因的表达异常。mtDNA 缺失可能是通过胞浆中某些蛋白质的磷酸化和去磷酸化后进入细胞核而引起 mtDNA 表达的异常,这种线粒体对核基因表达的调控,称为逆行调控 [7]。

本研究发现,mtDNA 缺失对核基因表达的影响比线粒体功能缺失的影响更大。进一步研究结果表明,mtDNA 缺失和线粒体功能缺失对细胞信号途径均有明显影响,而且它们对不同信号途径的影响又有很大差别。这些信号途径所包含的基因不同,基因的数量也不同,因此,推测对不同信号途径的影响差异可能是 mtDNA 缺失比线粒体功能缺失对核基因影响更大的主要原因。与核基因比较,mtRNA 更容易受到环境因素的影响而发生氧化性损伤 [8]。因此,mtRNA 缺失对核基

2.1.1 差异表达核基因数目的统计分析 聚类分析显示,mtDNA 缺失和线粒体功能缺失这 2 种细胞中核基因的表达与正常细胞比较均有明显变化。与正常 HepG2 细胞比较,在 41 000 个探针池中,mtDNA 缺失的细胞基因表达差异倍数  $> 2$  倍的有 5 489 个,其中上调的有 3 350 个,下调的有 2 139 个;而线粒体功能缺失的 HepG2 细胞基因表达差异倍数  $> 2$  倍的有 3 334 个,其中上调的有 1 457 个,下调的有 1 877 个。

2.1.2 核基因表达差异程度分析(图 1) 采用 2 组细胞基因表达的荧光信号比值绘制散点图,愈靠近 X 轴或 Y 轴的点则表明该点基因差异表达愈明显。从散点的分布看,A 中比 B 中靠近 X 轴或 Y 轴的点更多,其离散程度更大,表明 mtDNA 缺失 HepG2 细胞和正常 HepG2 细胞的基因表达差异比线粒体功能缺失 HepG2 细胞与正常 HepG2 细胞表达差异更明显。

因表达的影响可能是多种疾病发病的主要机制,mtRNA 缺失和线粒体功能缺失对不同信号途径的影响有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王学敏,杨雨,李孝基.线粒体和核基因的协作[J].国外医学:分子生物学分册,2000,22(3):171-174.
- [2] Taaman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1410(2): 103-123.
- [3] Vilhelm AB, Tinna S, Nadja C, et al Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells[J]. Gene, 2002, 286(1): 127-134.
- [4] 曹军,姜丽平,耿成燕,等.姜黄素致人结肠癌 HT-29 细胞 DNA 损伤作用[J].中国公共卫生,2009,25(6):665-666.
- [5] Cao J, Liu Y, Jia L, et al Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2007, 43(6): 968-975.
- [6] Koczor CA, Shokolenko N, Boyd AK, et al Mitochondrial DNA damage initiates a cell cycle arrest by a Chk2-associated mechanism in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(52): 36191-36201.
- [7] Ling F, Hori A, Shibata T. DNA recombination initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho-] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori $\delta$ [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(3): 1133-1145.
- [8] 韩维举,韩东一,杨伟炎.大鼠不同组织器官线粒体 DNA 缺失定量分析及其老化的关系[J].军医进修学院学报,2002,23(4):305-307.